

Article original

Influence d'un régime hyperprotéique sur la physiologie intestinale du rat Wistar

Influence of a hyperproteic diet on the intestinal physiology of the Wistar rat

B. Hellal^{a,*}, N. Ayad^a, M. Maaotug^b, T. Hellal^a

^a Département de l'environnement, faculté des sciences, université Dj-Liabes, 14, rue Zoubeir-Ibn-EL-Aouam, 22000 Sidi Bel'Abbes, Algérie

^b Faculté des sciences, université de Tiaret, 14000 Tiaret, Algérie

Reçu le 13 mai 2009 ; accepté le 21 janvier 2010

Résumé

But. – Étudier les conséquences de l'adaptation à un régime hyperprotéique à long terme sur les propriétés physiologiques de la muqueuse intestinale de rat Wistar.

Méthodes. – Cinq régimes sont administrés pendant 60 jours, à 96 rats mâles de souche Wistar répartis en cinq groupes. L'interaction des protéines du régime administrées aux rats, avec leur muqueuse intestinale, a été suivie in vitro sur des fragments d'iléon montés en chambre de Ussing, en précisant, l'effet de ces protéines sur le courant de court-circuit (Isc) et par la recherche d'anticorps spécifiques.

Résultats. – Les teneurs en titres IgG anticaséines et antiprotéines totales du lait montrent une différence significative comparés aux titres IgG anti- β -lactoglobuline et anti- α -lactalbumine. Des titres très élevés en IgG ont été obtenus chez les rats du premier et second groupe. L'addition de la β -lactoglobuline dans le compartiment séreux des fragments iléaux de ces deux groupes des rats entraîne une stimulation non significative du courant de court-circuit (Isc). La stimulation par les protéines totales du lait ou par les caséines ne montre aucune modification significative du courant de court-circuit (Isc).

Conclusion. – La haute teneur en protéines du lait du régime administré aux animaux provoque un phénomène d'immunisation orale à ces protéines. En revanche, l'interaction de ces protéines avec leur épithélium intestinal n'a pas d'effet significatif sur l'activité électrogénique des tissus, suggérant l'absence de réaction d'hypersensibilité immédiate.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Comportement alimentaire ; Fonction intestinale ; Gluten ; Intestin ; Lymphocytes intraépithéliaux (LIE) ; Protéines totales de lait ; Rats ; Régime hyperprotéique ; Soja

Abstract

The aim of the present work was to investigate the consequences of the administration over time of a hyperproteic diet on the physiological properties of the intestinal mucous membrane of the Wistar rat. Five diets were administered during 60 days to 96 male rats divided into five groups. The interaction of the rats' dietary proteins with their intestinal mucous membrane was studied in vitro by looking at the effect of these proteins on a short-circuit current (Isc) on fragments of ileum suspended in a Ussing chamber and also on specific antibody titers. The titers of IgG anti-caseins and anti-total milk proteins showed a significant difference compared to IgG anti- β -lactoglobulin and anti- α -lactalbumin titers ; very high IgG titers were observed in rats in the 1st and 2nd groups. The addition of β -lactoglobulin to the chamber containing the ileum fragments of the first and second group of rats resulted in non-significant stimulation of the short-circuit current. Total milk proteins or caseins caused no significant modification of the short-circuit current. In conclusion, a high dose of orally-administered milk proteins resulted in immunization of these rats. In contrast, the interaction of these proteins with their intestinal epithelium did not affect significantly the electrogenic activity of this tissue, suggesting the absence of a local immediate hypersensitivity reaction.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: High-protein diet; Milk protein; Rats; Intestinal function; Immune response

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : hellal_b@yahoo.com (B. Hellal).

1. Introduction

Le développement de l'épidémiologie descriptive et des enquêtes alimentaires a permis ces 20 dernières années, de mettre en évidence une augmentation de la consommation des produits d'origine animale dans tous les pays occidentaux, se traduisant par des ingestions de 1 à 2 g/kg par jour de protéines dans les pays industrialisés, ce qui correspond à une surconsommation de protéines par rapport aux recommandations estimées à 0,83 g/kg par jour [1–3].

Sur le plan nutritionnel, la consommation prolongée d'un régime riche en protéines fait l'objet de discussions et de controverses. Il semble que les conséquences de la consommation d'un régime hyperprotéique soient encore mal établies, et surtout que la limite supérieure tolérable de l'ingestion protéique reste à déterminer. Cependant, ces régimes auraient également des conséquences potentiellement négatives et certaines publications décrivent des effets indésirables des excès protéiques [4]. Ainsi, dans les pays industrialisés, la consommation prolongée d'un régime riche en protéines s'est manifestée par un taux élevé d'individus en surpoids. Ce serait un facteur d'obésité lorsque le régime hyperprotéique est suivi dès la petite enfance, selon certaines études épidémiologiques [5–8].

L'adaptation à un régime hyperprotéique met en jeu le métabolisme intestinal de l'entérocyte proportionnellement à l'afflux protéique luminal ce qui se traduit par une augmentation du poids de l'intestin grêle particulièrement celui de la muqueuse intestinale proximale [9].

Ce travail vise donc à évaluer les conséquences de l'adaptation à un régime hyperprotéique prolongé [10] par la recherche d'anticorps spécifiques. Il est complété par l'étude de l'interaction in vitro des protéines du régime administrées aux rats, avec la muqueuse intestinale des animaux, en précisant l'effet de ces protéines sur les paramètres électrophysiologiques de l'intestin, à savoir le courant de court-circuit (I_{sc} , $\mu A/cm^2$). Ce dernier reflète la sécrétion électrogénique de chlore au niveau intestinal correspondant à la somme algébrique des flux ioniques de part et d'autre de cet épithélium.

2. Matériel et méthodes

2.1. Régimes

Les régimes sont les suivants :

- le régime standard : (INRA-UPAE, Jouy-en-Josas, France), dénommé AIN 93 M, donné au groupe témoin et groupes expérimentaux. Il est constitué de 14 % de protéines totales de lait (P14PLT), d'amidon, de glucose, de fibres, de sels minéraux et de vitamines ;
- les régimes expérimentaux : hormis la teneur en protéines et en glucides, la composition en vitamines, sels minéraux et lipides est strictement identique entre le régime P14 (14 % de protéines) ;
- les régimes P50 (50 % de protéines totales du lait : PLT), G50 (50 % de protéines de gluten) et S50 (50 % de protéines de soja).

Les régimes P14 %, P50 % de PLT, soja et gluten, sont isocaloriques et isolipidiques. Tous les régimes sont administrés ad-libitum pendant 60 jours.

2.2. Animaux

Cinq groupes de 96 rats adultes de race Wistar (Harlan, Ganat, France) mâles, pesant entre 175 et 185 g sont répartis selon le Tableau 1.

2.3. Titres sériques en anticorps IgG antiprotéines de lait

Le sérum obtenu selon la méthode de Waynforth (1980) [11] est testé pour établir les titres sériques en anticorps IgG antiprotéines de lait et stocké à $-25^{\circ}C$ [12] ; ces titres, après dilution au 1:10, sont établis par la méthode Elisa [13].

2.4. Mesure du courant de court-circuit (I_{sc}) en chambre de Ussing

La mesure du courant de court-circuit (I_{sc}) permet de rechercher une éventuelle réponse anaphylactique locale en stimulant des fragments iléaux des rats avec des protéines du lait des régimes administrés.

Ce paramètre est mesuré en chambre de Ussing [14] permettant de présenter, de part, et, d'autre, une surface de l'intestin exposée sur 0,10 à 0,13 cm^2 . Les deux faces du tissu déterminent un compartiment muqueux et un compartiment séreux (Fig. 1). Ces deux compartiments sont chacun remplis avec 2 ml d'une solution de Ringer (pH 7,4). Le système est thermostaté à $37^{\circ}C$ et carbogéné avec un mélange gazeux (95 % O_2 et 5 % CO_2).

Tableau 1
Types et composition des régimes administrés aux cinq groupes de rats.

Groupe	n	Régime	Composition
1 (témoin)	30	Normoprotéique à 14 % de protéines totales du lait	80 % de caséines, 10 % de SAB 10 % de mélange β -lg et α -La
2	30	Hyperprotéique à 50 % de protéines totales du lait	80 % de caséines, 10 % de SAB 10 % de mélange β -Lg et α -La
3	12	ONAB (aliment d'entretien). normoprotéique	14,5 % de protéines végétales
4	12	Hyperprotéique	50 % de protéines de soja
5	12	Hyperprotéique	50 % de protéines de gluten

n : nombre de rats.

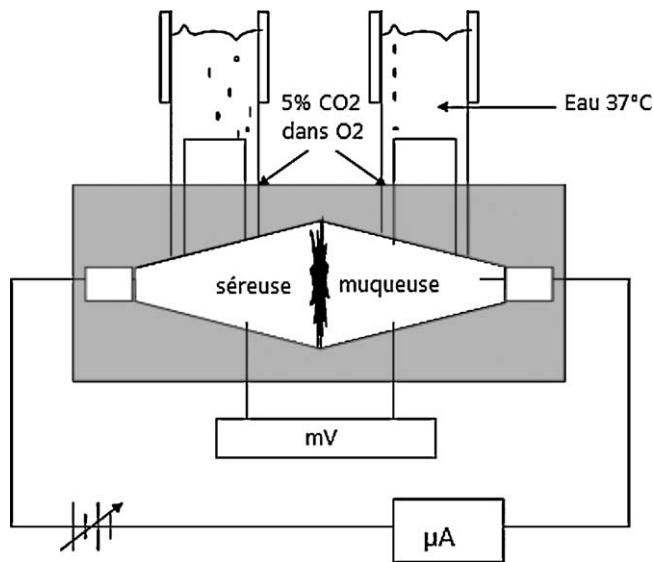


Fig. 1. Montage de la chambre de Ussing.

Au 60^e jour de régime, l'animal maintenu à jeun depuis la veille au soir est anesthésié au chloral à 10 % à raison de 3 ml/kg. Après laparotomie, un fragment iléal d'intestin de rat est étalé et monté à plat entre les deux demi-chambres de Lucite de la chambre de Ussing. Après stabilisation du système, la protéine sensibilisante est déposée dans le compartiment séreux à la concentration de 0,1 mg/ml ; les flux sont effectués en circuit ouvert.

La différence de potentiel transépithéliale (PD, mV) spontanée développée par le tissu est mesurée à l'aide d'un couple d'électrodes au calomel reliés par des ponts d'agar (KCL, 3 M).

La résistance du fluide (en absence du tissu) ainsi que la résistance du tissu monté en chambre de Ussing sont obtenues par application de la loi d'Ohm ($U = RI$). L'inverse de cette résistance donne la conductance ($G = 1/R$, mmho/cm²) qui représente l'index de la perméabilité de l'intestin aux électrolytes.

Ces deux paramètres sont mesurés en envoyant régulièrement dans le temps, grâce à un système d'électrodes Ag-AgCl connectés à une force électromotrice variable, de courtes impulsions de courant (10 μA) permettant de faire varier le potentiel transmembranaire de quelques millivolts. La différence de potentiel (PD, mV) et la conductance (G , mmho/cm²) sont mesurés toutes les deux minutes durant 30 minutes.

Le courant de court-circuit (I_{sc} , μA/cm²) est calculé par la loi d'Ohm. Avant stimulation, les valeurs de base du courant de court-circuit (I_{sc}) sont recueillies pendant 30 minutes. En fin d'expérience, le glucose (30 mM) est déposé dans les deux compartiments séreux et muqueux.

2.5. Analyse statistique

Elle est réalisée en utilisant le test de comparaison de deux moyennes, le test de Student *t* pour les des données non appariées. La comparaison de plusieurs moyennes est réalisée par l'analyse de variance (Anova).

3. Résultats

3.1. Évaluation des titres des IgG sériques antiprotéines du lait par Elisa

Les titres en IgG spécifiques dirigés contre les antigènes antiprotéines totales du lait, anti-β-lactoglobuline (β-Lg), anti-α-lactalbumine (α-La) et anticaséines détectés dans le sang des animaux des deux groupes (P14PLT, P50PLT) sont variables en fonction de la nature de la protéine et de sa teneur. Ainsi les valeurs moyennes ($\pm$ SE) des teneurs en titres IgG anticaséines et antiprotéines totales du lait montrent une différence significative comparées à celles des titres IgG anti-β-Lg et anti-α-La ($p < 0,001$). Nous avons obtenu des valeurs des titres très élevées en IgG des rats ayant consommé le régime à 14 % de l'ordre de 1/263^e pour les antigènes antiprotéines totales du lait (Fig. 2–5). Cela montre clairement que la haute teneur en protéines de lait des régimes P14PLT et P50PLT administrés aux animaux provoque un phénomène d'immunisation orale à ces protéines.

3.2. Effet des protéines sensibilisantes (β-Lg, protéines totales du lait, caséines) sur le courant de court-circuit (I_{sc}), de la muqueuse iléale de rats ayant consommé un régime hyperprotéique

L'addition de la β-Lg dans le compartiment séreux des fragments iléaux des rats du groupe P14PLT et le groupe P50PLT produit une stimulation non significative des valeurs moyennes ($\pm$ SE) du courant de court-circuit (I_{sc}) dont les valeurs restent stables durant toute l'expérience.

La stimulation par les protéines totales du lait ou par les caséines, ne montre aucune modification significative des valeurs moyennes ($\pm$ SE) du courant de court-circuit (I_{sc}) des tissus iléaux des animaux des groupes P14PLT et P50PLT.

Aucune modification significative sur les valeurs du courant de court-circuit (I_{sc}) n'étant observée, ces résultats suggèrent donc l'absence de réaction anaphylactique locale immédiate entre les protéines du lait et les éléments du système immunitaire de l'épithélium intestinal (Fig. 6–8).

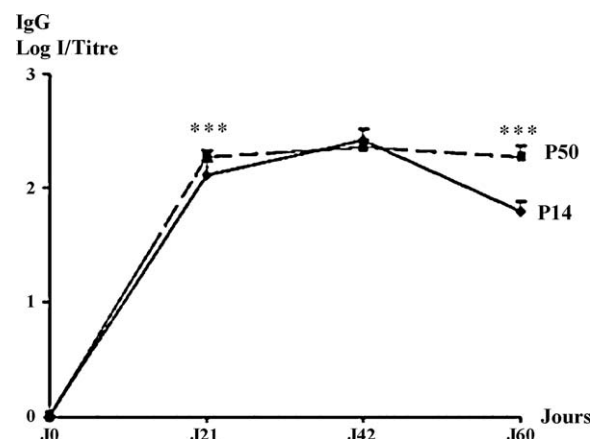


Fig. 2. Titres en IgG antiprotéines totales du lait, mesurés par la technique Elisa chez les rats des groupes P14PLT et P50PLT. *** ($p < 0,001$).

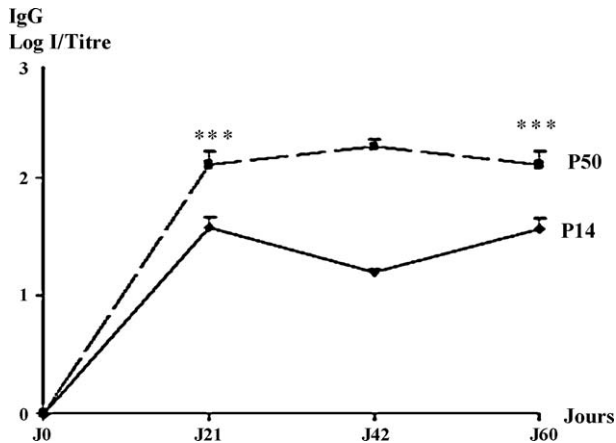


Fig. 3. Titres en IgG anticasséines, mesurés par la technique Elisa chez les rats des groupes P14PLT et P50PLT. *** ($p < 0,001$).

4. Discussion

Notre étude est orientée vers l'analyse des effets de l'ingestion par le rat Wistar pendant 60 jours d'un régime à 50 % de protéines d'origine animale et d'un régime à 50 % de protéines d'origine végétale, comparé chacun à un groupe témoin nourri à l'aide d'un régime normoprotéique à 14 %. Elle porte sur les conséquences de ce régime sur la fonction intestinale.

En se basant sur l'hypothèse que l'ingestion chronique prolongée et à doses élevées de protéines du lait pourrait entraîner une immunisation orale des animaux, la réponse immune a été évaluée, d'une part, au niveau systémique par la recherche d'anticorps spécifiques et, d'autre part, au niveau muqueux intestinal sur la base d'une étude *in vitro* par la méthode de la chambre de Ussing.

4.1. Évaluation des titres des IgG sériques antiprotéines du lait

Nos résultats indiquent que les rats nourris à l'aide d'un régime à forte teneur en protéines développent des anticorps sériques de type IgG dirigés contre les protéines ingérées. Les titres sont cependant variables en fonction de la nature de la

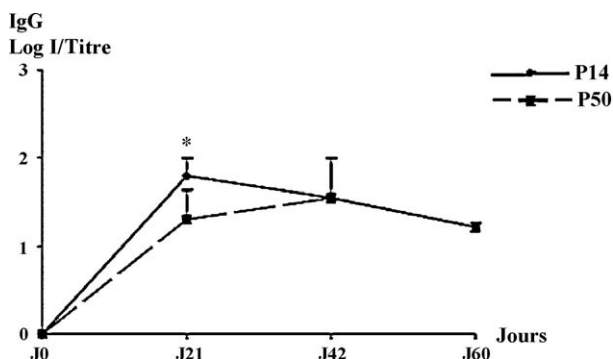


Fig. 4. Titres en IgG anti- α -La mesurés par Elisa chez les rats des groupes P14PLT et P50PLT. * ($0,01 \leq p \leq 0,05$).

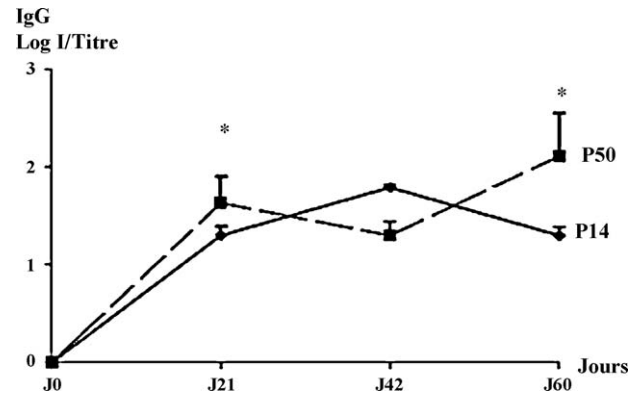


Fig. 5. Titres en IgG anti- β -Lg mesurés par Elisa chez les rats des groupes P14PLT et P50PLT. * ($0,01 \leq p \leq 0,05$).

protéine et de sa teneur. Les rats ont une réponse en anticorps proportionnelle à l'importance de chaque fraction de protéines.

Ainsi, la teneur en titres IgG anticasséines est proportionnelle du taux de caséines présent dans les régimes (P14 % et P50 %) PLT. Ces IgG anticasséines et antiprotéines totales de lait montrent une différence significative comparée aux titres anti- β -Lg et anti- α -La. Les titres mesurés témoignent d'un état d'immunisation par voie orale des animaux. La production de ces anticorps chez le rat est un phénomène physiologique [15]. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une intervention du système immunitaire associé au tube digestif (GALT) et dont l'augmentation des Lymphocytes intraépithéliaux (LIE) serait une manifestation.

Ces résultats concordent avec la littérature, qui montrent que l'administration des protéines de lait de vache par voie orale ou parentérale aux animaux induit la production d'anticorps sériques de type IgG [16,17]. Le faible titre d'IgG semble être en accord avec d'autres travaux qui ont émis l'hypothèse que la majorité des protéines administrées par la voie orale stimuleraient faiblement l'immunité humorale locale [18],

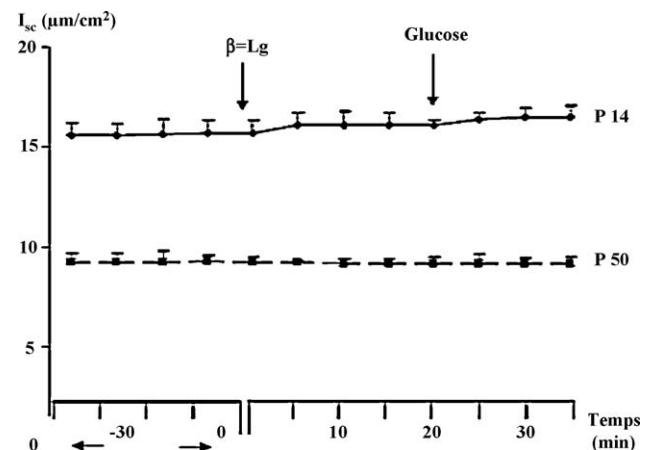


Fig. 6. Effet de la β -Lg sur le courant de court-circuit (I_{sc}) des fragments d'iléon de rats du groupe P14PLT « régime normoprotéique à 14 % » et du groupe P50PLT « régime hyperprotéique à 50 % », montés en chambre de Ussing.

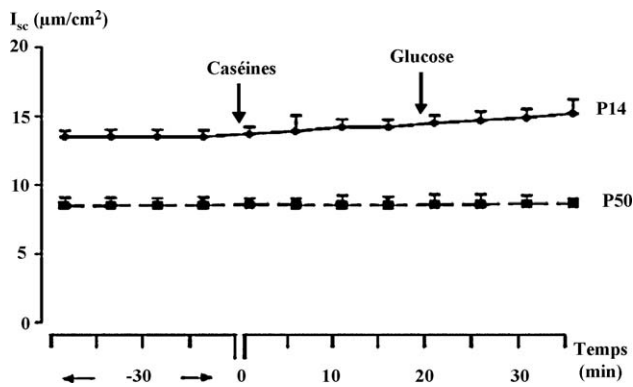


Fig. 7. Effet des caséines sur le courant de court-circuit (Isc) des fragments d'iléon de rats du groupe P14PLT « régime normoprotéique à 14 % » et du groupe P50PLT « régime hyperprotéique à 50 % », montés en chambre de Ussing.

contrairement à l'immunisation par voie parentérale qui provoque des titres plus importants [19].

4.2. Effet de l'interaction des protéines totales de lait, β -Lg et caséines sur la fonction intestinale des rats ayant consommé le régime hyperprotéique

On note la présence d'anticorps IgG dirigés contre toutes les protéines du lait du régime administré aux animaux, confirmant les propriétés immunomodulatrices de la β -Lg, de α -lac et des caséines. En revanche, l'étude en chambre de Ussing montre que l'interaction de la β -Lg et des caséines avec l'épithélium intestinal ajoutées dans le versant séreux n'a pas d'effet significatif sur l'activité électrogénique des tissus, suggérant l'absence de réaction d'hypersensibilité immédiate. Ces résultats montrent bien que l'ingestion de protéines en forte teneur n'est pas sans conséquences sur la composition corporelle et la fonction intestinale.

L'étude est menée à l'aide du dispositif de la chambre de Ussing qui avait pour but d'étudier l'interaction des antigènes avec les cellules immunocompétentes pour vérifier l'existence d'une éventuelle réaction anaphylactique locale au niveau de

l'intestin grêle des animaux des deux groupes P50PLT et du groupe P14PLT et de préciser cette action sur les mouvements des électrolytes (sodium et chlore, essentiellement) reflétés par le courant de court-circuit (Isc).

L'interaction des différentes protéines utilisées (β -Lg, protéines totales de lait et caséines) avec la muqueuse intestinale des rats consommant le régime hyperprotéique n'entraîne aucune modification significative du courant de court-circuit (Isc). L'augmentation du courant de court-circuit (Isc) est traditionnellement attribuée à la sécrétion du chlore, c'est-à-dire à une sécrétion de l'eau. Le glucose a été déposé afin de vérifier si les fragments intestinaux conservent toujours leur intégrité structurale ainsi que leurs propriétés physiologiques.

Un aspect important peut être dégagé à l'issue de notre étude : les rats ayant consommé un régime riche en protéines d'origine animale ou végétale n'ont pas développé une anaphylaxie locale, observée normalement dans les modèles d'allergie aux protéines de lait de vache (APLV non immunologique) lesquels se traduisent par une stimulation significative du courant de court-circuit (Isc) chez les animaux sensibilisés par voie parentérale à la β -Lg et à l' α -lac[20], cela constituerait un élément d'adaptation physiologique quant à l'utilisation de ce régime à long terme, mais par un infiltrat qui témoigne incontestablement d'une inflammation locale. L'étude des profils de cytokines TH1/TH2 et un comptage par marquage de l'infiltrat des cellules du chorion devrait mieux renseigner sur le rôle exercé par les éléments du GALT.

Une étude a montré qu'un régime hyperprotéique produit moins de dommages oxydatifs qu'un régime normoprotéique [21]. Cependant, une surconsommation de protéines pourrait être à l'origine de dysfonctionnement pouvant toucher différents organes et altérer la fonction intestinale. Il a été démontré également que de consommer, en grandes quantités des protéines d'origine animale a un effet carcinogène sur l'intestin.

5. Conclusion

Cette étude contribue à identifier les conséquences de l'adaptation des rats adultes de race Wistar aux variations de l'apport protéique alimentaire et plus spécifiquement à montrer les effets sur les capacités d'adaptation de la fonction intestinale à ce régime.

La limite supérieure tolérable d'ingestion protéique est définie comme la valeur maximale d'ingestion protéique ne produisant aucun effet délétère sur la santé. Aucune réaction anaphylactique locale n'a été observée, après stimulation des fragments iléaux des rats avec des protéines du lait des régimes administrés à l'aide du dispositif de la chambre de Ussing. Donc, quelles seraient les conséquences de la consommation d'un tel régime sur une vie entière ?

On sait aujourd'hui que la restriction calorique est un des facteurs alimentaires qui est le plus corrélé avec l'allongement de la durée de vie chez l'animal, en retardant les signes du vieillissement. Il convient donc d'observer une certaine prudence dans l'utilisation prolongée de formules diététiques

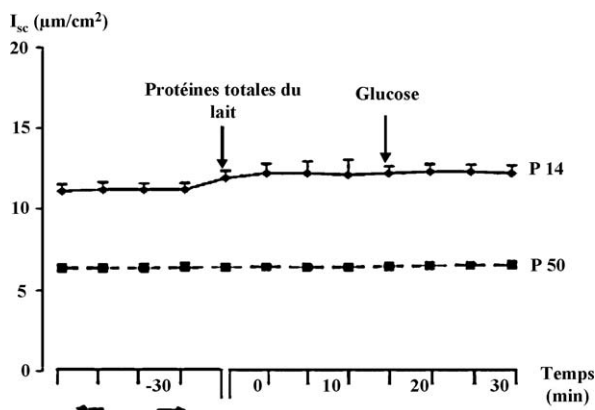


Fig. 8. Effet des protéines totales du lait sur le courant de court-circuit (Isc) des fragments d'iléon de rats du groupe P14PLT « régime normoprotéique à 14 % » et du groupe P50PLT « régime hyperprotéique à 50 % », montés en chambre de Ussing.

hyperprotéiques chez l'homme afin d'éviter tout risque pour la santé humaine [21].

Conflit d'intérêt

Aucun.

Références

- [1] Food and Agriculture Organization/World Health Organization/United Nation University. Protein quality evaluation. Food and Agricultural organization of the United Nation, FAO Food and Nutrition. Rome 1990;51.
- [2] Rigaud D, Giachetti I, Deheeger M, Bory JM, Volatier JL, Lemoine A, et al. Enquête française de consommation alimentaire I. Énergie et macronutriments. *Cah Nutr Diet* 1997;32:379–89.
- [3] Food and Agriculture Organization/World Health Organization/United Nation University. Energy and protein requirements. WHO Tech Rep Ser, WHO 1985; n° 724 Genève.
- [4] Chow WH, Gridley G, McLaughlin JK, Mandel JS, Wacholder S, Blot WJ, et al. Protein intake and risk of renal cell cancer. *J. Natl Cancer Inst* 1994;86:1131–9.
- [5] Rolland-Cachera MF, Deheeger M, Akrouit M, Bellisle F. Influence of macronutrients on adiposity development: a follow-up study of nutrition from 10 months to 8 years of age. *Int J Obesity* 1995;19:573–8.
- [6] Weissgarten J, Modai D, Averbukh M. High protein diet or unilateral nephrectomy induces a humoral factor(s) that enhances mesangial cell proliferation in culture. *Nephron* 1998;79:201–5.
- [7] Dunger A, Berg S, Kloting I, Schmidt S. Functional alterations in the rat kidney induced either by diabetes or high protein diet. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997;105:48–50.
- [8] Scaglioni S, Agostoni C, De Notaris R. Early macronutrient intake and overweight at five years of age. *Int J Obesity* 2000;24:777–81.
- [9] Jean C, Rome C, Mathé V, Huneau JF, Aattouri N, Fromentin G, et al. Metabolic evidence for adaptation to high protein diet in rat. *J Nutr* 2001;131:91–8.
- [10] Bensaid A, Tomé D, Gietzen D, Even P, Morens C, Gausseres N, et al. Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiol Behav* 2002;75:577–82.
- [11] Waynforth HB. Experimental and surgical techniques in the rat. London: Academic Press; 1980, 68.
- [12] Isolauri E, Gotteland M, Heyman M, Pochart P, Desjeux JF. Antigen absorption in rabbit bacterial diarrhea (RDEC-1) In vitro modifications in ileum patches. *Dig Dis Sci* 1990;35:360–6.
- [13] Engvall E, Pearlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay Elisa. *J Immunol* 1972;1:129–35.
- [14] Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta physiol Scand* 1951;23:110–27.
- [15] Fritsche R, Bonzon M. Determination of cow milk formula allergenicity in the rat model by in vitro mast cell triggering and in vivo IgE induction. Switzerland *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;93(4):289–93.
- [16] Knippels LM, Houben GF, Spanhaak S, Penninks AH. An oral sensitization model in brown Norway rats to screen for potential allergenicity of food proteins. *Methods* 1999;19:78–82.
- [17] Knippels LM, Van Der Kleij HP, Koppelman SJ, Houben GF, Penninks AH. Comparaison of antibody responses to hen's egg and cow's milk proteins in orally sensitized rats and food allergic patient. *Allergy* 2000;55:251–8.
- [18] Weiner HL. Oral tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10762–5.
- [19] Ayad N, Hellal B, Maatoug M. Sensibilisation parentérale du lapin aux protéines du lait de vache : effets sur la perméabilité intestinale. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2006;46:696–700.
- [20] Ayad N, Hellal B, Maatoug M. Sensibilisation parentérale du lapin aux protéines du lait de vache : effets sur les paramètres électrophysiologiques de l'intestin. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2008;48:9–13.
- [21] Petzke KJ, Elsner A, Proll J, Thielecke F, Metges CC. Long-term high protein intake does not increase oxidative stress in rats. *J Nutr* 2000;130:2889–96.